取扱説明書

ReproCryo DMSO Free™

Cat. No. RCHEFC002
Version 1.0

概要

この取扱説明書は、ヒト ES/iPS 細胞を緩慢方法で凍結、解凍する方法について説明しています。

培養操作は安全キャビネット内で無菌下にて行ってください。

製品について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

保存方法

本品は冷凍状態で発送されます。到着後すみやかに-20℃で保存して下さい。使用前に解凍し、解凍後は 2～8℃で保存して下さい。小分け保存する場合は、小分け後、-20℃で保存してください。解凍後は 2 週間を目安に使い切って下さい。凍結融解は繰り返さないで下さい。

特長

・ヒト iPS 細胞 (Takahashi, K., et al., *Cell*, 131, 861-72, 2007) でロット試験済みです。
・浸透圧、pH、滅菌、マイコプラズマ検査済みです。
・DMSO は含まれておりません。
・Chemically defined で Xeno Free の成分構成です。
・緩慢凍結法の凍結保存液です。

本製品をご使用の際は以下の点にご注意ください。

・ReproCryo DMSO Free™ は、ヒト ES/iPS 細胞懸濁液に対して半量を添加してください。その際、15 mL チューブをゆらして混合しながら、10 秒かけてゆっくり入れてください。
・ReproCryo DMSO Free™ を添加後に恒温槽で 30 分間インキュベーションして下さい。
・凍結時には、凍結保存容器あるいはプログラムフリーザーを用いて-1℃/分で-80℃まで凍結してから、液体窒素に入れ替えてください。
・凍結保存容器（BICELL あるいはミスターフロスティ等）あるいはプログラムフリーザーで凍結開始後、3 時間から 6 時間以内に液体窒素へ凍結バイアルを入れてください。
・ 解凍後に新しい培地で希釈する際には、チューブをゆらして混合しながら、10 秒かけてゆっくり入れてください。

目次

・本製品及び必要試薬と装置
・ReproCryo DMSO Free™ を用いた凍結・解凍プロトコル
  - **機器の準備**
  - **ヒト ES/iPS 細胞の凍結方法**
  - **ヒト ES/iPS 細胞の解凍方法**
  - **解凍後の代表的な生存率と増殖性**

・よくある質問

本製品

製品	Cat. No.	容量	保管方法
ReproCryo DMSO Free™	RCHEFC002	50 mL	-20 °C

必要試薬と装置

製品	Cat. No.	容量	保管方法
凍結保存容器（BICELL/Mr.Frosty 等）あるいはプログラムフリーザー			
ESGRO Complete™ Accutase™	Millipore SF006	100 mL	4 °C
Y27632	-	-	-
PBS (-). Ca^{2+}- and Mg^{2+}-Free	-	-	-
60 mm Tissue Culture Dish	-	-	-
その他培養操作に通常必要なもの	-	-	-

ReproCryo DMSO Free™ を用いた凍結・解凍プロトコル

機器の準備

1. 凍結保存容器あるいはプログラムフリーザーを 4℃に冷やしておいてください。
2. 恒温槽を 37℃に設定してください。

ヒト ES/iPS 細胞の凍結方法

注 1：以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です。
注 2：各培地で培養したヒト ES/iPS 細胞を継代するタイミングの細胞量で凍結を行ってください。
注 3：細胞懸濁液に対して半量の ReproCryo DMSO Free™ を、15 mL チューブをゆらして混合しながら、10 秒かけてゆっくり入れてください。
注 4：ReproCryo DMSO Free™ を添加後に恒温槽で 30 分間インキュベーションをして下さい。
注 5：凍結時には、凍結保存容器あるいはプログラムフリーザーを用いて-1℃/分で-80℃まで凍結してから、液体窒素に入れ替えてください。
注 6：凍結保存容器あるいはプログラムフリーザーで凍結開始後、3 時間から 6 時間以内に液体窒素へ凍結バイアルを入れてください。

1. ReproCryo DMSO Free™ を冷蔵庫に一晩おいて解凍してください。解凍後は、適量に分注して－20℃で保存してください。
2. オンフィーダーあるいはフィーダーフリー培養のヒト ES/iPS 細胞を用意してください。
3. 上清を除去して、PBS (-) 2 mL で細胞を洗ってください。
4. PBS (-)を除去して、ESGRO complete ACCUTASE™ 1 mL を加えてください。
5. 37℃、5%CO_2 インキュベーターに 10 分おいてください。
6. ディッシュを取り出して、培養時の培地を 1 mL 加えてください。
7. P-1000 ピペットで細胞を剥がして、細胞懸濁液を 15 mL チューブへ移してください。（細胞はシングルセルの状態となります。）
8. 300×g、5 分間、室温で遠心し、上清をできるだけ除去してください。
9. 培養時の培地を 0.5 mL 加えて、細胞を懸濁してください。
10. 細胞懸濁液に 0.5 mL の ReproCryo DMSO Free™ を、10 秒かけてゆっくり加えてください。この時 15 mL チューブをゆらして混合しながら行ってください。
11. 37℃の恒温槽で 30 分間インキュベーションしてください。
12. 細胞が底に溜まりますので、10 分毎に一時的に取り出して、P-1000 ピペットで 2 回ピペッティングして均一にしてください。
13. 30 分後、細胞懸濁液を 15 mL チューブからクライオチューブに移してください。
14. 予め 4℃に冷やしておいた凍結保存容器に移して－80℃冷凍庫へ 3 時間から 6 時間いれて凍結してください。プログラムフリーザーをご使用の場合は－1℃／分に設定して－80℃まで凍結してください。
15. 液体窒素を用意して、冷凍庫あるいはプログラムフリーザーからクライオチューブを取り出して、直ぐに凍結させてください。

16. 凍結されたチューブは、液体窒素タンク等の中へ保管してください。

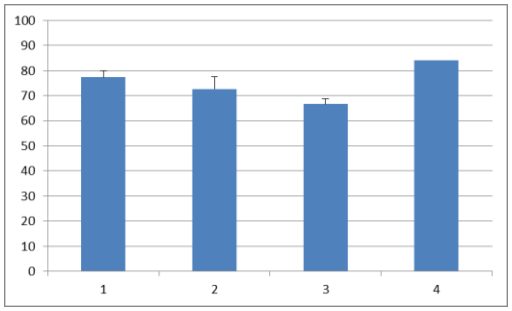
ヒト ES/iPS 細胞の解凍方法

注 7：以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です。
注 8：解凍後に新しい培地で希釈する際には、チューブをゆらして混合しながら、10 秒かけてゆっくり入れてください。

1. 恒温槽を 37℃に設定してください。培養用の培地を 10 mL 分注して温めておいてください。
2. 液体窒素を用意して、凍結バイアルを移して、恒温槽近くまで運んでください。
3. 恒温槽で凍結バイアルを左右にゆらしながら混合して、2 分温めてください。
4. P-1000 ピペットで細胞懸濁液を 2 回ピペッティングしてから、15 mL チューブに移してください。
5. 温めておいた培地を 1 mL 取り、10 秒かけてゆっくり加えてください。その時に 15 mL チューブをゆらしながら混合してください。
6. 2 分間静置してください。
7. 温めておいた培地を 5 mL 取り、30 秒かけてゆっくり加えてください。その時に 15 mL チューブをゆらしながら混合してください。
8. 300×g、5 分間、室温で遠心し、上清をできるだけ除去します。
9. 培地を 4 mL 加えて、細胞懸濁液を調製してください。
10. フィーダー上あるいはコーティング済のディッシュに細胞懸濁液を加えてください。
11. 終濃度が 10 μM になるように Y-27632 を添加してください。移行後 24 時間までは、Y-27632 を添加してください。それ以降の培地交換時には不要です。
12. 細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、5%CO_2 インキュベーターで培養します。
13. 翌日、培地交換を行います。

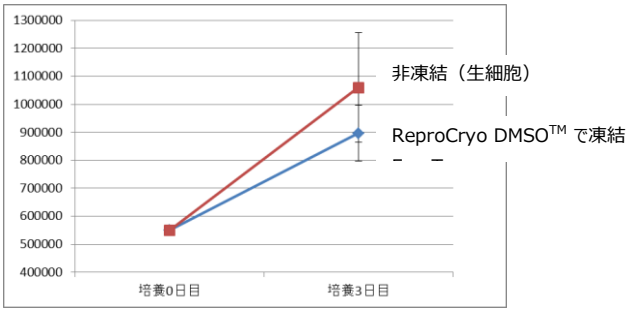
解凍後の代表的な生存率と増殖率

解凍後の生存率



補足 1）複数 Lot の ReproCryo DMSO Free™ を用いてヒト iPS 細胞を凍結した。解凍後の生存率は 60－90%を示した。
（縦軸：生存率%、横軸：Lot 番号、n=3）

解凍後の増殖性



補足 2）3 日間培養した場合、凍結していない細胞の増殖性と比較して、ReproCryo DMSO Free™ を用いて凍結した細胞は同様の増殖性を示した。
（縦軸：細胞数、横軸：培養日数、n=3）

よくある質問

Q1. 凍結時に－80℃の冷凍庫で一晩おいてもよいですか？
A1. 解凍時の生存率が下がりますので、3 時間から 6 時間以内に取り出して液体窒素にいれてください。

Q2. オンフィーダーとフィーダーフリーの細胞で凍結できますか？
A2. 両培養方法にご使用いただけます。

Q3.この ReproCryo DMSO Free™ でガラス化法の凍結はできますか？
A3.できません。緩慢法での凍結をお願い致します。

ReproCELL Inc.
https://www.reprocell.com
E-mail: info_jp@reprocell.com